

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420791

研究課題名(和文)「補酵素A再生系」に基づく高光学純度ヒドロキシ酸の高効率生産

研究課題名(英文) Efficient production of high optical pure hydroxy acid based on the regeneration of coenzyme A

研究代表者

大井 俊彦 (Ooi, Toshihiko)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：40223713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が新規に開発したグルコースから高光学純度の(R)-3-ヒドロキシ酪酸((R)-3HB)の微生物合成システムを、高効率で(R)-3HB生産可能な微生物工場を創成する基盤技術を確立した。合成中間体である3種のCoA体の細胞内蓄積量を定量する新規分析法を開発し、アセチル-CoAへのフラックス向上が生産性に影響を与えることを見出し、グルコース消費速度の高い宿主菌株を選択した。培地中に添加するグルコース及び酢酸濃度の至適化を行い15g/Lの(R)-3HB生産性を達成した。一方添加する酢酸濃度が高いと生育が阻害されるので、培地交換培養法により効率的な高光学純度(R)-3HB生産法を達成できた。

研究成果の概要(英文)：Optical purity of building block are essential for the chemical synthesis of bioactive compounds, such as antibiotics and pheromone. Chemical synthesis of optically active compounds are not so easy because of no optical selective synthesis. We developed basic technology of the biosynthesis method for optically active [R]-3-hydroxybutylate (3HB) with high purity using engineered microbiological system. We have newly developed the quantifying analytical method for intermediate compounds of [R]-3HB biosynthesis and found that the improvement of the flux to Acetyl-CoA is effective to produce [R]-3HB production. On the basis this results Escherichia coli JM109 was selected as a high glucose consumption strains. Using this strain the concentrations of glucose and acetate into the medium was optimized. Productivity of high optically pure [R]-3HB was archived to 15g/l in optimized culture condition. In addition newly cultivation technology was further developed for the efficient production.

研究分野：応用微生物学

キーワード：キラル化合物 ヒドロキシ酸 3-ヒドロキシ酪酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 医療や農薬などに応用される抗生物質やフェロモンなどの生理活性を有する化合物を化学的に大量に有機合成するために、合成の出発物質には高光学活性の材料(ビルディングブロック)が必須となる。このようなビルディングブロックを有機化学的に合成する場合、高い光学純度で合成することは困難であることが多いことから、微生物や酵素を応用した生合成方法の開発が注目されている。しかし化学合成で要求される高い光学活性を持つ多くの化合物の効率的な生産システムの例はそれほど多くはなく、さらなる高光学純度を持った多種の化合物の生産系が開発が望まれている。

(2) 我々は多剤耐性菌にも有効な抗生物質として知られ医療にも使われるカプトプリルなどのβ-ラクタム系抗生物質のビルディングブロックとなる高光学純度の[R]-3-ヒドロキシ酪酸([R]-3HB)の微生物合成に注目した。これまでの研究例では、ある種の微生物が細胞内にエネルギー化合物として蓄積するバイオリマーであるポリヒドロキシ酪酸(P(3HB))を、自身の分解酵素であるデポリメラーゼを発現させることにより生産する方法とP(3HB)の生合成系を応用し、その生合成過程にある生合成中間化合物である3HB-CoAのCoA部分をチオラーゼを用いて加水分解する方法が報告されていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、これまでの報告例からP(3HB)の生合成系の生合成過程にある生合成中間化合物である3HB-CoAのCoA部分を上述したチオラーゼによって加水分解させる方法ではなく、高エネルギー化合物である3HB-CoAのCoA部分をエネルギーロスなしに酢酸に転移させアセチル-CoAを生じる酵素、PCT(プロピオニル-CoAトランスフェラーゼ)を応用した。この酵素を利用する利点は、3HB-CoAの酢酸へのCoAの転移によって生じるアセチル-CoAは、3HB-CoAの上流にある生合成中間体であるので、3HB-CoA生合成に使われ最終的に効率よく3HBが生産できるプロセスを構築できることである。

そこで、このPCTを利用した高光学純度の[R]-3-ヒドロキシ酪酸(3HB)の微生物合成法を開発し、効率的な[R]-3HB生産方法の基盤技術を確立するために以下の項目について研究を行った。

[R]-3HB生合成過程における律速段階の反応を特定するために代謝中間体の精密な定量方法の開発。

[R]-3HB生産宿主である大腸菌種をグルコース消費速度及び酢酸耐性の2つの観点から選抜する。

バイオマス由来の糖質であるグルコースからの[R]-3HBの高効率的な生産のために、培養工学的な見地から培養条件の最適化及び培養法の開発を行うことによって、最終的

に組換え大腸菌による高光学純度の[R]-3HB微生物効率生産系を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) [R]-3HB微生物生産条件の検討

ある種の微生物は窒素分が枯渇した場合、細胞内にエネルギー貯蔵物質として、バイオプラスチックの一種であるポリヒドロキシ酪酸(P(3HB))を著量蓄積することが知られている。この生合成にはグルコースなどの糖から解凍系を経て合成される代謝中間体であるアセチル-CoAを二量化する酵素PhaA(ケトチオラーゼ)により、アセトアセチル-CoAが生成され、次いでPhaB(アセトアセチル-CoA還元酵素)により水和され3-ヒドロキシ酪酸(3HB-CoA)に変換される。さらにこの化合物が重合しポリヒドロキシ酪酸(P(3HB))となるが、この生合成系の間mediateである3HB-CoAを生じるPhaBは厳密な[R]選択性を持っていることから、我々の研究グループは3HB-CoAのCoA部分をPCTにより酢酸に転移させて効率的な[R]-3HBを生産させる生合成を開発した。

本生合成には効率的な上述した生合成中間体のCoA転移反応を効率よく進行させるために、酢酸を微生物培養中に添加する必要があるが、培地中の酢酸濃度が高くなると微生物の生育を阻害することから、培養時に添加するグルコースと酢酸の添加濃度とモル比について、[R]-3HBの生産性を指標に検討した。

(2) 宿主大腸菌の選抜

[R]-3HB生産に最適な宿主大腸菌を選抜するために、グルコース消費速度および酢酸に対する耐性の両観点から、宿主大腸菌の増殖を指標に選抜した。

(3) 生合成の律速段階の定量評価

[R]-3HB生合成中間体である3種のCoA体(アセチル-CoA、アセトアセチル-CoA、3HB-CoA)を正確に定量評価することで、各酵素反応の律速段階があるかを経時的に評価するための分析方法を開発した。各培養時間まで培養した培養液を素早く氷冷し、遠心分離により4、5minの条件で集金した、上清を捨て氷冷したmilliQ水を加えて検だくした後、0.1Mギ酸を含む氷冷アセトニトリルを加えた後超音波処理にて菌体を破砕した。は最後遠心分離により上清を回収し、液体窒素により凍結させた後、真空乾燥機によりアセトし取りを除去した。次に氷冷した超純水を加えて溶解させた後、0.22μmのフィルターでろ過し、LC-MSにより定量分析した。

(4) 律速反応段階の強化

PhaB及びPCTを進化工学的に改変する事で得られた高活性変異酵素を導入することで、[R]-3HB生産性が向上するかどうかを検討し

た。

(5)培養工学による [R]-3HB 生産最適条件の検討

生産組換え大腸菌の[R]-3HB 生産性の向上を図るため、3HB-CoA の CoA ドナーとなる酢酸の添加濃度及び逐次添加培養について検討をした。

加えて、グルコース及び酢酸を添加して生産大腸菌を培養し、[R]-3HB を生産させた培養液を遠心分離により回収し、再度新しい培地を添加する連続培地交換法による[R]-3HB の生産法について検討した。

培養には 1%バクトトリプトン、0.5% 酵母エキス、1% 食塩を含む LB 培地に、グルコース及び酢酸の添加濃度を变化させた培地を用い 30、180 回転の条件で振盪培養を行った。

4. 研究成果

(1)プロトタイプの[R]-3HB 生産系ではグルコース 1 分子から 1 分子の[R]-3HB が生産されるが、アセチル-CoA の再生系を加味すると 0.5 分子の[R]-3HB が増加することから、この 0.5 分子に相当する酢酸を添加した培地を用いた。グルコースと酢酸を添加して培養し、培養上清中の[R]-3HB を逆相カラムを用いた HPLC で定量した結果、5.2g/l の[R]-3HB を清算した。その際の[R]-3HB 生産速度は 0.21 g/l/hr であった。添加した酢酸が PCT によりアセチル-CoA に再生されているかを確かめるために、PCT 遺伝子を欠損させて培養を行った。その結果[R]-3HB は検出されなかったことから PCT が[R]-3HB 生産に有効に機能していることが示唆された。

さらに、¹³C で標識した酢酸を添加して[R]-3HB を生産させ、質量分析計で分析したところ、生産された[R]-3HB 分子中に ¹³C が取り込まれていたことから、PCT を利用した本[R]-3HB 生合成系が想定通り機能していることが確認された。

(2) [R]-3HB を効率よく生産させるために、グルコースの消費速度及び酢酸の耐性の両側面から宿主として用いる大腸菌を選抜した。各種大腸菌を 1%グルコースを踏む LB 培地で 24 時間 30 で振盪培養して増殖させた結果、JM109 株が最も高い菌体密度をしました。また酢酸に対する増殖阻害も試験した大腸菌の中でも比較的高かったことから、JM109 株を[R]-3HB 生産の宿主として選択した。

(3) [R]-3HB 生合成系の律速反応段階を検討するために 3 種の CoA 中間体を LC-MS により定量評価した。LC-MS の分析の結果、[R]-3HB 生産条件に於いて、大腸菌細胞内にアセチル-CoA が最も多く蓄積していた。アセチル-CoA を二量化してアセトアセチル-CoA を精製する酵素の PhaA の反応は可逆反応であることが知られており、反応生成物であるアセトアセチル-CoA を速やかに次の反応に進行させ

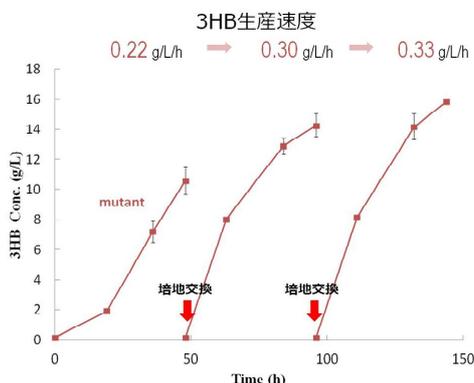
ることでアセチル-CoA のプール料を減少させることができると考えられたため、生じたアセトアセチル-CoA から 3HB-CoA を生成する PhaB の反応は不可逆反応であるので、PhaB が触媒する反応または後段の PCT による CoA 転移反応のどちらかが速やかに進行すれば、細胞内にプールされていたアセチル-CoA は PhaA の反応により減少し、効率的に[R]-3HB 合成の方向に傾かせることができると考えられた。

(4) [R]-3HB 生合成過程の律速段階を触媒する酵素の候補として PhaB および PCT が考えられたため、進化工学的に高活性変異体を作製した。両酵素遺伝子をエラープローン PCR によって作製した変異体ライブラリーより P(3HB)の生産量が増加した株を選抜した。選抜方法は LB 寒天培地でのナイルレッドでの呈色反応を利用したプレートアッセイにより選抜した。

獲得した高活性変異酵素遺伝子を[R]-3HB 生合成ベクターに導入し、導入した組換え大腸菌株を用いて[R]-3HB の生産を検討した。培養の結果、ワイルドタイプと比較して PhaB の Q47 及び T173 変異体は約 17%生産量が向上した。一方 PCT の高活性変異酵素である Y458 では[R]-3HB の生産量は 5%程度しか向上せず効果が低かった。両変異酵素を用いた場合の[R]-3HB 生産量は約 20%向上させることができた。

(5) 効率的な[R]-3HB 生産条件を培養工学的に検討するために、培地に添加するグルコースと酢酸の濃度を検討した。培養は 30 で 180 回転の振盪培養の条件で行った。グルコースの濃度を 1% g から 10%までの条件で振盪培養し、[R]-3HB の生産量を比較した場合、グルコース添加濃度が 6%の培養条件で最も高い[R]-3HB 生産量が得られた。次に酢酸の添加濃度条件も同様に検討したところ、酢酸濃度が 0.66%の培養条件の場合は 8.53g/l の[R]-3HB が生産された。さらに、グルコース濃度が 6%で、酢酸添加濃度を 1.5 倍の 0.99%に増加させた場合、最大で約 15 g/l にまで[R]-3HB の生産量が増加し、プロトタイプの場合と比べて、生産量は約 3 倍向上することができた。

添加するグルコース及び酢酸濃度の最適化条件で [R]-3HB 生産性の向上が達成されたが、培養後期には[R]-3HB の生産がほぼ停止し生産速度が低下することが明らかとなった。生産速度の低下を回避し、[R]-3HB の生産を高い生産速度を維持した状態のままに継続させる培養条件を検討するために、生産速度の低下が始まる 24 時間ごとに、培養上清を取り除き、菌体を新しい培地に入れ替える培地交換法の有効性を検討した。その結果、高い[R]-3HB 生産(14 g / l 以上)を維持しながら培地交換3回目まで最大の0.33 g / l / h の生産速度まで達した。



研究者番号：40223713

(2)研究分担者

松本 謙一郎 (Matsumoto Ken'ichiro)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：80360642

(3)連携研究者

田口 精一 (Taguchi Seiichi)
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：70216828

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Ken'ichiro MATSUMOTO, Kota TOBITANI, Shunsuke AOKI, Yuyang SONG, Toshihiko OOI, Seiichi TAGUCHI: "Improved production of poly(lactic acid)-like polyester based on metabolite analysis to address the rate-limiting step", AMB Express, 4:83, (2014).

Doi: 10.1186/s13568-014-0083-2

〔学会発表〕(計 2件)

三吉大地、瀬戸望、松本謙一郎、大井俊彦、田口精一：組換え大腸菌を用いた高光学活性(R)-3-ヒドロキシブタン酸の生産におけるCoA 転移酵素高活性変異体の効果、日本農芸化学会2015年度大会、岡山

瀬戸望、大井俊彦、松本謙一郎、田口精一：組換え大腸菌を利用した高光学純度(S)-3-ヒドロキシブタン酸の生産、日本農芸化学会2015年度大会、岡山

〔産業財産権〕

取得状況(計 1件)

名称：CoA 転移酵素を用いる有機酸の製造法

発明者：松本謙一郎、田口精一、青木裕史

権利者：松本謙一郎、田口精一、青木裕史

種類：再公表特許

番号：W02013/058150

取得年月日：平成27年4月2日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://labs.eng.hokudai.ac.jp/labo/seika/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大井 俊彦 (Ooi Toshihiko)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授